

⑫

**EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG**

⑳ Anmeldenummer: 79101113.3

⑤① Int. Cl.<sup>2</sup>: **G 01 N 33/16**

**C 07 G 7/00, G 21 H 5/00**

㉔ Anmeldetag: 11.04.79

③① Priorität: 18.04.78 DE 2816841

④③ Veröffentlichungstag der Anmeldung:  
31.10.79 Patentblatt 79 22

⑥④ Benannte Vertragsstaaten:  
BE CH DE FR GB IT LU NL SE

⑦① Anmelder: Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der  
Wissenschaften e.V.  
Bunsenstrasse 10  
D-3400 Göttingen(DE)

⑦② Erfinder: Timpl, Rupert, Dr.  
Bergstrasse 18  
D-8033 Krailling(DE)

⑦④ Vertreter: Weickmann, Heinrich, Dipl.-Ing. et al,  
Postfach 860 820 Möhlstrasse 22  
D-8000 München 86(DE)

⑤④ Verfahren zur radioimmunologischen Bestimmung von Prokollagen (Typ III) und Prokollagen-Peptid (Typ III), zur Herstellung von für das Verfahren geeignetem Prokollagen-Peptid (Typ III) und zur Herstellung von Anti-Prokollagen-Peptid (Typ III)-Serum.

⑤⑦ Zur radioimmunologischen Bestimmung von Prokollagen (Typ III) und Prokollagen-Peptid (Typ III) werden eine bestimmte Menge radioaktiv markiertes Prokollagen (Typ III) oder Prokollagen-Peptid (Typ III) und ein hochspezifisches Anti-Prokollagen- (Typ III) -Serum bzw. Anti-Prokollagen-Peptid-(Typ III)-Serum gemeinsam mit einer Probe mit unbekanntem Gehalt an Prokollagen (Typ III) oder Prokollagen-Peptid (Typ III) zur Reaktion gebracht, der gebildete Antigen-Antikörper-Komplex wird abgetrennt, zweckmäßig durch Zusatz eines gegen das hochspezifische Antiserum gerichteten zweiten Antikörpers, und die Radioaktivität des Komplexes oder des Überstandes gemessen. Hierfür geeignetes hochgereinigtes Prokollagen-Peptid (Typ III) erhält man durch Abbau von Gewebe oder Körperflüssigkeiten mit Kollagenase und Reinigung durch Immunadsorption und Chromatographie.

**EP 0 004 940 A1**

BEZEICHNUNG GEÄNDERT  
siehe Titelseite

- 1 -

Radioimmunologische Bestimmung von Prokollagen  
(Typ III) und Prokollagen-Peptid (Typ III).

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur radioimmuno-  
logischen Bestimmung von Prokollagen (Typ III) und Pro-  
kollagen-Peptid (Typ III) und die Herstellung eines für  
dieses Verfahren geeigneten Prokollagen-Peptids (Typ  
5 III).

Prokollagen (Typ III) ist eine biosynthetische Vorläu-  
ferform eines speziellen Kollagens (Typ III), das  
hauptsächlich im retikulären Bindegewebe vorkommt. Es  
10 unterscheidet sich von Kollagen (Typ III) durch ein zu-  
sätzliches, am Aminoende lokalisiertes Peptidsegment  
(Prokollagen-Peptid (Typ III)), das sich durch Behand-  
lung mit Kollagenase vom Molekül abspalten läßt.

15 Neuere Immunofluoreszenz-Untersuchungen haben gezeigt,  
daß fibrosierende Prozesse, die z. B. bei Leberzirrho-  
se und Hepatitis auftreten, von einem hohen Umsatz von  
Prokollagen (Typ III) und Prokollagen-Peptid (Typ III)  
begleitet sind. Der Nachweis dieser im Blut zirkulie-  
20 renden Antigene erlaubt deshalb eine frühzeitige Erken-  
nung derartiger Erkrankungen.

Immunhistologische Untersuchungen gestatten zwar einen  
spezifischen Nachweis dieser Antigene, lassen sich aber

nicht quantitativ auswerten. Dadurch ist die Aussagekraft derartiger Methoden begrenzt.

5 Der Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, dieses Problem zu lösen und ein quantitatives, rasch und einfach durchzuführendes Verfahren zur Bestimmung dieser Antigene zu schaffen.

10 Es wurde nun gefunden, daß eine quantitative Messung derartiger Antigene durch eine radioimmunologische Bestimmungsmethode möglich ist.

Ein Gegenstand der Erfindung ist daher ein Verfahren zur radioimmunologischen Bestimmung von Prokollagen (Typ III) und Prokollagen-Peptid (Typ III), bei dem 15 eine bestimmte Menge radioaktiv markiertes Prokollagen (Typ III) oder Prokollagen-Peptid (Typ III) und ein hochspezifisches Anti-Prokollagen-(Typ III)-Serum oder ein Anti-Prokollagen-Peptid-(Typ III)-Serum gemeinsam 20 mit einer Probe mit unbekanntem Gehalt an Prokollagen (Typ III) oder Prokollagen-Peptid (Typ III) zur Reaktion gebracht werden. In der vom Radio-Immuno-Assay (RIA) an sich bekannten Weise konkurriert hierbei das radioaktiv markierte Prokollagen bzw. Prokollagen-Peptid 25 mit dem in der zu bestimmenden Probe enthaltenen, nicht-markierten Prokollagen oder Prokollagen-Peptid um den Antikörper, so daß im gebildeten Antigen-Antikörper-Komplex die Radioaktivität um so geringer ist, je mehr nichtmarkiertes Prokollagen bzw. Prokollagen-Peptid in 30 der zu bestimmenden Probe enthalten ist. Der gebildete unlösliche Antigen-Antikörper-Komplex kann in üblicher Weise aus der Lösung abgetrennt und die darin enthaltene Radioaktivität bestimmt werden. Alternativ ist es auch möglich, die in der Lösung, also im Überstand der 35 Abtrennung des Antigen-Antikörper-Komplexes, verblei-

bende Radioaktivität zu messen. Anhand einer Eichkurve, die mittels Proben von bekanntem Gehalt an Prokollagen oder Prokollagen-Peptid erstellt wurde, läßt sich dann die in der zu untersuchenden Probe enthaltene Menge Pro-  
5 kollagen oder Prokollagen-Peptid feststellen.

Die Trennung des Antigen-Antikörper-Komplexes von der Lösung kann nach den hierfür dem Fachmann bekannten, üblichen Methoden erfolgen, wie Abfiltrieren, Absaugen, 10 Abzentrifugieren und dergleichen. Auch ist es möglich, das Antiserum an einen festen Träger, beispielsweise die Innenwand eines Reagenzglases gebunden, anzuwenden.

Vorzugsweise wird das Verfahren so durchgeführt, daß die 15 Trennung des mit dem hochspezifischen Anti-Prokollagen-(Typ III)-Serum oder mit dem Anti-Prokollagen-Peptid-(Typ III)-Serum gebildeten Antigen-Antikörper-Komplexes von dem nichtumgesetzten Antigen durch die Verwendung eines gegen das hochspezifische Serum gerichteten zweiten Antikörpers erfolgt. Bevorzugt wird hierfür ein An- 20 tikörper gegen  $\gamma$ -Immunglobulin der für die Gewinnung des Antiserums verwendeten Tierart.

Die Markierung des Antigens, d. h. des Prokollagens 25 (Typ III) oder Prokollagen-Peptids (Typ III) mit dem Radionuclid, kann mit den für die Radiomarkierung von Proteinen bekannten Methoden durchgeführt werden. Als Radionuclid wird vorzugsweise Jod 125 verwendet. Zur Markierung mit diesem Radionuclid wird die Chloramin- 30 T-Methode (Int. Arch. Allergy, 29 185) bevorzugt.

Für die erfindungsgemäße Bestimmungsmethode ist es ent- scheidend, daß eine geeignete Quelle zur Gewinnung von Prokollagen-Peptid (Typ III) zur Verfügung steht. Es 35 hat sich nun gezeigt, daß die Herstellung von humanem

oder tierischem, hochgereinigtem Prokollagen-Peptid (Typ III) aus Tiergewebe oder pathologischen Körperflüssigkeiten möglich ist, wenn das Gewebe mit Kollagenase abgebaut und das Prokollagen oder Prokollagen-Peptid aus dem Kollagenase-Extrakt oder der Körperflüssigkeit abgetrennt und durch Kombination von chromatographischen Methoden und/oder Immunadsorption gereinigt wird.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist daher ein Verfahren zur Herstellung eines für das erfindungsgemäße Bestimmungsverfahren geeigneten hochgereinigten Prokollagen-Peptids (Typ III), welches dadurch gekennzeichnet ist, daß humanes oder tierisches Gewebe oder pathologische Körperflüssigkeit oder Kollagen-Extrakte derselben mit Kollagenase abgebaut und das dabei gebildete Prokollagen oder Prokollagen-Peptid aus dem Kollagenase-Extrakt oder der Körperflüssigkeit abgetrennt und chromatographisch oder durch Immunadsorption oder durch Kombination dieser Methoden gereinigt wird.

Als Tiergewebe haben sich fetale Kälberhaut und als Körperflüssigkeit humane Ascites-Flüssigkeit besonders ergiebig zur Gewinnung des Prokollagen-Peptids (Typ III) erwiesen.

Die Reinigung mittels Immunadsorption wird zweckmäßig wie folgt durchgeführt: In einem ersten Schritt werden gereinigte Antikörper gegen Prokollagen-Peptid (Typ III) unlöslich gemacht. Die Reinigung der verwendeten Antikörper erfolgt zweckmäßig über Affinitätschromatographie, es können jedoch auch die anderen für die Antikörperreinigung an sich bekannten Methoden angewendet werden. Bevorzugt werden aus Kaninchen gewonnene Antikörper verwendet. Die Unlöslichmachung erfolgt durch Fixierung an einen festen Träger nach den bekannten Me-

thoden der Fixierung biologisch aktiver Proteine an feste Träger. Bevorzugt erfolgt die Bindung an mit Bromcyan aktivierte Agarose oder diazotierte p-Aminobenzylcellulose. Mit dem so hergestellten Antikörperadsorbens werden die gegebenenfalls vorgereinigten Extrakte bzw. Körperflüssigkeiten dann inkubiert. Das Prokollagen-Peptid (Typ III) bindet hierbei an das Antikörperadsorbens und wird dann, zweckmäßigerweise nach Waschen des Trägers, mit geeigneten Elutionsmitteln wieder eluiert. Geeignete Elutionsmittel lassen sich durch einfache Versuche leicht ermitteln. Besonders geeignet erwies sich etwa 3 molare KSCN-Lösung für die Elution, jedoch lassen sich selbstverständlich auch andere Salzlösungen verwenden.

Das so hergestellte gereinigte Prokollagen-Peptid (Typ III) wird dann zur Immunisierung verwendet und so nach den üblichen Methoden der Antiserumgewinnung ein hochspezifisches Anti-Prokollagen-Peptid-(Typ III)-Serum hergestellt. Zweckmäßigerweise erfolgt die Immunisierung durch subkutane Injektion von Prokollagen-Peptid (Typ III) in Versuchstiere, vorzugsweise Kaninchen, in Gegenwart des kompletten Freund'schen Adjuvans. In diesem bevorzugten Fall beträgt die Antigendosis dabei zweckmäßigerweise etwa 2 mg/Tier.

Der erfindungsgemäße Radio-Immun-Test erlaubt die Messung von Konzentrationen bis in den Bereich von 1 ng/ml. Damit ist es möglich, den Test zur Feststellung von Antigenen in Humansenen einzusetzen. Ein Vergleich von Probanden mit Leberfibrose zeigte einen bis zu zehnfachen Anstieg in der Konzentration des Antigens, wodurch Lebererkrankungen sicher festgestellt werden können.

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung weiter.

B e i s p i e l 1

Durchführung des Radio-Immun-Tests:

5 25 µg Prokollagen-Peptid (Typ III) werden mit 1 Milli-  
Curie Jod 125 nach der Chloramin-T-Methode markiert und  
ungebundenes Jod durch Dialyse entfernt. Die weiteren  
Schritte bei der Herstellung des Radio-Immun-Tests wer-  
den vorzugsweise in Gegenwart von 0,04 % eines nichtio-  
10 nischen Detergens, wie z. B. Tween 20, durchgeführt. Bin-  
dungskurven mit Antikörper werden mit 2 ng markiertem  
Peptid bestimmt. Die Konzentration an Prokollagen-Pep-  
tid (Typ III) in einer unbekannten Probe von Serum oder  
anderen Körperflüssigkeiten wird in folgendem Inhibi-  
15 tionstest bestimmt:

Eine bestimmte Menge des Antikörpers wird mit der unbe-  
kannten Probe 6 Stunden bei 4°C vorinkubiert und nach  
Zugabe von 2 ng markiertem Peptid weitere 12 Stunden bei  
4°C inkubiert. Danach wird ein Überschuß von Antikörper  
20 gegen Kaninchen-γ-Immunglobulin zugesetzt und das im  
Immunkomplex gebundene Antigen aus der Lösung abgetrennt.  
Die Inhibitionsaktivität der unbekannten Probe wird mit  
der Aktivität einer Standard-Konzentration von nichtmar-  
kiertem Prokollagen-Peptid (Typ III) verglichen.

25

B e i s p i e l 2

Herstellung von Prokollagen-Peptid (Typ III):

30 Prokollagen-Peptid (Typ III) wird hergestellt durch Ein-  
wirkung von Kollagenase auf Prokollagen (Typ III) bei  
37°C. Hierbei wird das Peptid keinen Denaturierungsmit-  
teln ausgesetzt. Zur Herstellung größerer Mengen des  
Peptids wird ein modifiziertes Verfahren angewendet.  
35 Alle Verfahrensschritte bis zur Einwirkung der Kollage-

nase werden im Kälteraum durchgeführt. Die verschiedenen NaCl-Lösungen, die zur Löslichmachung eingesetzt werden, enthalten 0,05 M Tris-HCl, pH 7,4, 0,01 M ÄDTA, Natriumazid (200 mg/ml) und die Proteasen-Inhibitoren  
5 Phenylmethylsulfonylfluorid (3 µg/ml) und p-Chlormercuribenzoat (3 µg/ml).

Fetale Kälberhaut (3 kg) wird in 10 l 1 M NaCl homogenisiert und zwei Tage lang extrahiert. Gelöstes Kollagen wird aus dem Extrakt gefällt durch Zugabe von festem NaCl bis zu einer Endkonzentration von 2,5 M. Nach  
10 Rühren über Nacht wird das Präzipitat durch Zentrifugierung gesammelt (1800 xg, 20 Minuten), zweimal mit 2,5 M NaCl gewaschen und wieder aufgelöst, indem es über Nacht  
15 in 10 l 0,5 M NaCl gerührt wird. Kleine Mengen unlöslichen Materials werden durch Zentrifugierung entfernt. Die so erhaltene Mischung von Kollagen (Typ III) und Prokollagen (Typ III) wird dann mit 1,6 M NaCl gefällt. Das Präzipitat wird dann in 2 l 0,05 M Tris-HCl (pH 8,0)  
20 suspendiert und nach Zusatz von 0,02 M CaCl<sub>2</sub> 20 Minuten lang bei 50°C erhitzt und anschließend 3 Stunden bei 37°C zusammen mit 1500 Einheiten bakterieller Kollagenase pro Gramm feuchtes Präzipitat inkubiert. Nach Einwirkung der Kollagenase wird das gebildete Präzipitat  
25 durch Zentrifugierung abgetrennt und die Lösung dialysiert gegen 0,005 M Tris-HCl, pH 8,6, 8 M Harnstoff und über die DEAE-Cellulosesäule (5,0 x 30 cm) gegeben, die mit dem gleichen Puffer äquilibriert wurde.

30 Die auf der Säule gebundenen Proteine werden mit NaCl-Lösungen ausgewaschen, deren Konzentration von 0 bis 0,3 M ansteigt. Die gesamte Elutionsmenge beträgt 2 l. Die aus der Säule ausfließende Lösung wird bezüglich der Adsorption bei 236 nm und ihrer Antigenaktivität  
35 durch Verwendung von Antikörpern überprüft, die spezi-



fisch für das amino-terminale Segment des Prokollagens  
(Typ III) sind. Normalerweise enthält der letzte Peak,  
der aus der Säule eluiert wird, das Prokollagen-Peptid  
(Typ III). Das Peptid wird durch Dialyse gegen destil-  
5 liertes Wasser entsalzt und lyophilisiert. Die weitere  
Reinigung erfolgt auf einer Säule mit Agarose A 1,5 M  
(2 x 120 cm), die mit 1 M  $\text{CaCl}_2$ , 0,05 M Tris-HCl, pH  
7,5, äquilibriert ist.

10

- 1 -

P a t e n t a n s p r ü c h e

1. Verfahren zur radioimmunologischen Bestimmung von Prokollagen (Typ III) und Prokollagen-Peptid (Typ III),  
dadurch g e k e n n z e i c h n e t , daß eine bestimm-  
te Menge radioaktiv markiertes Prokollagen (Typ III)  
5 oder Prokollagen-Peptid (Typ III) und ein hochspezifi-  
sches Anti-Prokollagen-(Typ III)-Serum bzw. Anti-Pro-  
kollagen-Peptid-(Typ III)-Serum gemeinsam mit einer Pro-  
be mit unbekanntem Gehalt an Prokollagen (Typ III) oder  
Prokollagen-Peptid (Typ III) zur Reaktion gebracht wer-  
10 den, der gebildete Antigen-Antikörper-Komplex abgetrennt  
und die Radioaktivität des Komplexes oder des Überstan-  
des gemessen wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch g e k e n n -  
15 z e i c h n e t , daß ein mit einem Radionuclid markier-  
tes Prokollagen (Typ III) oder Prokollagen-Peptid (Typ  
III) verwendet wird.
3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch g e k e n n -  
20 z e i c h n e t , daß als Radionuclid Jod 125 verwendet  
wird.
4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,  
dadurch g e k e n n z e i c h n e t , daß der aus Anti-

Prokollagen-(Typ III)-Serum bzw. Anti-Prokollagen-Peptid-(Typ III)-Serum und Prokollagen (Typ III) bzw. Prokollagen-Peptid (Typ III) gebildete Antigen-Antikörper-Komplex von nichtumgesetztem Antigen durch Zusatz eines  
5 gegen das hochspezifische Antiserum gerichteten zweiten Antikörpers und Abtrennung des damit gebildeten Komplexes vom Überstand, abgetrennt wird.

5. Verfahren zur Herstellung von für das Verfahren  
10 von Anspruch 1 bis 4 geeignetem hochgereinigtem Prokollagen-Peptid (Typ III), dadurch g e k e n n z e i c h -  
n e t , daß humanes oder tierisches Gewebe oder pathologische Körperflüssigkeiten bzw. Kollagenextrakte da-  
von mit Kollagenase abgebaut und das dabei gebildete  
15 Prokollagen oder Prokollagen-Peptid abgetrennt und durch Kombination von chromatographischen Methoden und/oder Immunadsorption gereinigt wird.

6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch g e k e n n -  
20 z e i c h n e t , daß als Tiergewebe fetale Kälberhaut bzw. als Körperflüssigkeit humane Ascitesflüssigkeit eingesetzt wird.

7. Verfahren zur Herstellung eines hochspezifischen  
25 Anti-Prokollagen-Peptid-(Typ III)-Serums, dadurch g e k e n n z e i c h n e t , daß ein nach Anspruch 5 oder 6 hergestelltes Prokollagen-Peptid (Typ III) zur Immunisierung von Versuchstieren verwendet und deren Serum gewonnen wird.

30



Europäisches  
Patentamt

# EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

0004940

Nummer der Anmeldung

EP 79 101 113.3

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int.Cl.)
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	betrifft Anspruch	
A	<u>DE - A - 1 598 945</u> (PHARMACIA) * ganzes Dokument *		G 01 N 33/16 C 07 G 7/00 G 21 H 5/00
A	ANGEWANDTE CHEMIE, 88. Jahrgang, Nr. 17, 1976, Weinheim H.G. ECKERT, "Die Technik des Radio- immunoassays" Seiten 565 bis 573		
A	MEDIZINAL-MARKT/ACTA MEDICOTECHNICA, 25. Jahrgang, Nr. 10, 1977, Berlin H.MEINHOLD, "Nuklearmedizinische in-vitro-Diagnostik im Submikrobereich" Seiten 317 bis 322		RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int.Cl.)  C 07 G 7/00 G 01 N 33/16 G 21 H 5/00
A,D	INTERNATIONAL ARCHIVES OF ALLERGY, Band 29, 1966, Basel P.J. McCONAHEY et al. "A Method of Trace Iodination of Proteins for Immunologic Studies" Seiten 185 bis 189		KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE X. von besonderer Bedeutung A. technologischer Hintergrund O: nichtschriftliche Offenbarung P: Zwischenliteratur T. der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E: kollidierende Anmeldung D: in der Anmeldung angeführtes Dokument L: aus andern Gründen angeführtes Dokument &: Mitglied der gleichen Patent- familie, übereinstimmendes Dokument
X	Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt.		
Recherchenort	Abschlußdatum der Recherche	Prüfer	
Berlin	16-07-1979	SCHWARTZ	

EPA form 1503.1 06.78